

微生物远红外波段复折射率测定及模型构建*

孙杜娟 胡以华[†] 顾有林 王勇 李乐

(脉冲功率激光技术国家重点实验室(电子工程学院), 合肥 230037)

(电子制约技术安徽省重点实验室, 合肥 230037)

(2012年9月21日收到; 2013年1月7日收到修改稿)

选择枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体等3种典型微生物制备生物样品, 采用显微红外光谱仪对3种微生物样品在2.5—15 μm 波段的红外反射光谱进行测定, 基于Kramers-Kronig (K-K)关系计算得到了微生物样品在6—14 μm 波段的复折射率. 以水、蛋白质和核酸的红外吸收特性为基础, 根据微生物样品的红外吸收谱线计算了微生物样品含水量. 在3种微生物远红外波段复折射率和含水量的实测数据基础上, 构建了生物颗粒在6—14 μm 远红外波段的复折射率模型, 分析了模型的可靠性. 模型的构建对发展生物样品的快速分析、鉴定方法, 进而推动生物气溶胶探测、识别技术进步具有重要意义.

关键词: 光学参数, 微生物复折射率模型, 远红外波段

PACS: 42.87.-d, 42.87.Bg

DOI: 10.7498/aps.62.094218

1 引言

生物气溶胶主要由微生物菌体、微生物孢子以及花粉等生物颗粒组成, 由自然界或人类生产、生活产生, 是大气气溶胶的重要组成部分, 对人类的生产、生活产生重要影响, 是食品、医疗、卫生甚至公共安全领域的重点关注对象. 发展有效的生物颗粒分析、鉴定方法进而推动生物气溶胶探测、识别技术的进步, 一直以来都是国内外军事和民用各领域的研究热点.

国内外针对生物颗粒分析、鉴定以及生物气溶胶的探测和识别, 已经开展了大量的研究工作^[1-7]. 常规的培养基生化法、核酸探针杂交法、荧光法和免疫法等^[1-5]方法以生物细胞中特有的蛋白质、核酸、多糖等物质的生、化、电、磁特性为基础, 区分生物和非生物物质, 已经被应用于生物气溶胶探测中, 相应地生物气溶胶探测装置业已研制. 但是, 这些传统方法普遍存在着技术手段复杂、检测耗时长、检测信号微弱等缺点, 并且仅能判断气溶胶是否生物物质, 而难以判断其生物属性

(或类型). 因此, 急需发展更加有效、精确、实时的生物气溶胶探测、识别技术.

目前, 基于生物颗粒电磁散射特性的生物气溶胶探测、识别技术的相应研究工作已经开展^[6,7]. 该方法主要以气溶胶中生物颗粒的电磁特性为基础, 通过实验测定电磁波在气溶胶透过率以及散射光的偏振特征分析, 确定气溶胶中生物颗粒的浓度、尺寸和种类. 但是, 应用该方法必须事先掌握生物颗粒的复折射率参数并且了解不同种类生物颗粒的复折射率差异. 而生物颗粒的复折射率, 特别是关于微生物的复折射率测定及分析内容的公开文献非常少. 目前能够查阅到的文献, 主要是微生物在可见光波段和近红外波段的复折射率数据^[8], 涉及的生物种类很少且测定数据在生物气溶胶探测、识别过程中缺乏通用性.

本实验室利用大型发酵罐培养制备枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 黑曲霉孢子 (*Aspergillus niger* spores) 和黑曲霉菌丝体 (*Aspergillus niger* mycelium) 等3种典型微生物型样品, 利用显微红外光谱仪和傅里叶变换红外光谱仪, 测定上述3种微生物样品在6—14 μm 远红外波段的复折射率和含水量, 并

* 国家自然科学基金(批准号: 61271353)资助的课题.

[†] 通讯作者. E-mail: skl_hyh@163.com

在此基础上构建生物颗粒远红外波段复折射率模型. 将生物颗粒远红外波段复折射率模型应用于基于生物颗粒电磁散射特性的生物气溶胶探测、识别, 不仅可以为生物气溶胶的探测提供必要参数, 还能够预估各类生物颗粒远红外波段复折射率数据, 进而在实测数据的基础上实现对生物气溶胶的识别.

2 微生物样品复折射率测定实验

2.1 理论基础

如图 1 所示, 电磁波在 2 种不同材料形成的界面上会发生反射和折射. 根据 Kramers-Kronig (K-K) 关系 [9,10], 对于垂直入射电磁波, 材料的反射相移 $\Theta(\lambda)$ 可以利用下式计算 [11,12]:

$$\Theta(\lambda) = \frac{\lambda}{\pi} P \int_0^{\infty} \frac{\ln R(\lambda')}{2(\lambda'^2 - \lambda^2)} d\lambda'^2, \quad (1)$$

式中, $R(\lambda)$ 为材料的全波段垂直入射反射率, λ 为反射波长; P 为 Cauchy 主值函数.

根据 (1) 式计算材料在波长 λ 处的反射相移 $\Theta(\lambda)$, 需要测定材料的全波段垂直入射反射率. 而实际上, 考虑到电磁波的有效利用范围, 以及实验仪器的工作波段, 只能测定材料在有限波段范围内的反射率. 材料在其他波段的反射率通过经验公式外推或常数外推得到 [13,14].

假设材料复折射率 $m(\lambda)$ 为 $m(\lambda) = n(\lambda) + ik(\lambda)$, 实部 $n(\lambda)$ 和虚部 $k(\lambda)$ 可以根据反射率 $R(\lambda)$ 和反射相移 $\Theta(\lambda)$ 计算 [11,12], 即

$$n(\lambda) = \frac{1 - R(\lambda)}{1 + R(\lambda) + 2\sqrt{R(\lambda)} \cos \Theta(\lambda)}, \quad (2)$$

$$k(\lambda) = \frac{-2\sqrt{R(\lambda)} \sin \Theta(\lambda)}{1 + R(\lambda) + 2\sqrt{R(\lambda)} \cos \Theta(\lambda)}. \quad (3)$$

2.2 微生物样品制备和反射光谱测定

枯草芽孢杆菌和黑曲霉菌种由中国科学院离子束生物工程重点实验室提供, 经“菌种活化 → 摇瓶培养 → 大型发酵罐发酵 → 离心机离心 → 纯净水清洗 → 真空冷冻干燥机干燥 → 超细中药粉碎机粉碎”的流程制成微生物样品. 枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体样品分别为黄色、黑色和褐色. 样品存放于实验室的干燥皿中, 室温条件下保藏.

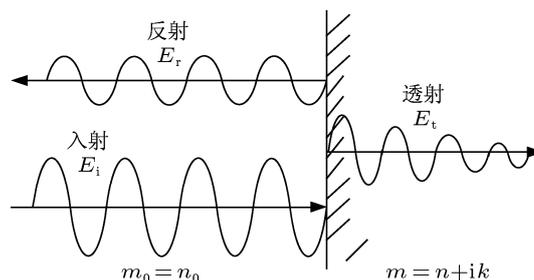


图 1 垂直入射光在平面上的反射和折射

使用红外压片机制作枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子、黑曲霉菌丝体样品压片. 利用美国热电公司 Nicolet Continuum 显微红外光谱仪采集压片在 $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ 波段的镜面反射光谱. 光谱仪光斑尺寸为 $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$, 以镀金反射镜面作为背底, 每个压片选取 3 个采样点进行反射光谱测定, 取 3 次测定结果的平均值. 显微红外光谱仪相对傅里叶光谱仪光斑尺寸更小, 单个光斑内压片表面更加光滑、平整, 测定的反射率光谱更加接近理想的镜面反射光谱. 样品在 $2.5\text{--}15\text{ }\mu\text{m}$ ($650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) 波段的反射光谱测定结果如图 2 所示, 图中每种样品的反射谱为 3 次测试结果的平均值, 横坐标 wave band 为波数, 纵坐标 reflectivity 为反射率.

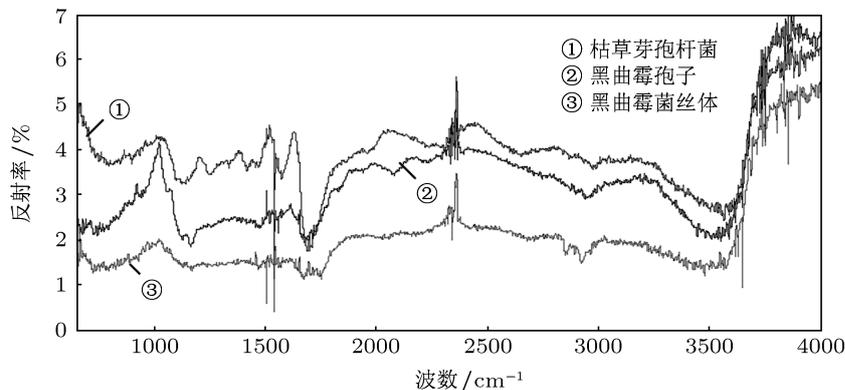


图 2 3 种微生物样品的 $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ 波段反射谱

2.3 微生物样品远红外波段复折射率计算

采用常数外推方法将 3 种微生物样品在 2.5—15 μm 波段的反射率 $R(\lambda)$ 外推到整个频段, 其中, 0—2.5 μm 波段内, $R(\lambda)$ 等于 $R(2.5 \mu\text{m})$; 15—100 μm 波段内, $R(\lambda)$ 等于 $R(15 \mu\text{m})$. 由于 100 μm 以上波长处的材料反射率对 2.5—15 μm 波段内材料的复折射率影响可以忽略, 所以这里采用 100 μm 作为积分上限^[13,14]. 这样就得到了 3 种样品的整个积分范围 (0—100 μm) 内的 $R(\lambda)$, 代入 (1)—(3) 式. 3 种微生物样品在 6—14 μm 波段内的复折射率 m

的实部 n 与虚部 k 计算结果如表 1 所示. 2.5—6 μm 波段内的样品复折射率 m 的实部 n 的计算结果偏低, 虚部 k 计算结果为正数, 明显与真实值不符合, 因此 2.5—6 μm 波段内的样品复折射率计算结果不能采用, 表 1 中没有给出这一波段的计算结果. 造成上述结果的原因在于, 2.5—6 μm 波段范围较窄, 该波段内计算结果受 0—2.5 μm 波段反射率值影响极大, 采用常数外推或者经验公式外推得到反射率值与 0—2.5 μm 波段的压片反射率的真实值之间的差异导致了 2.5—6 μm 波段复折射率 m 的实部 n 与虚部 k 计算结果误差较大.

表 1 6—14 μm 波段内枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体样品复折射率 m 计算结果, $m = n + ik$

$\lambda/\mu\text{m}$	枯草芽孢杆菌		黑曲霉孢子		黑曲霉菌丝体	
	n	k	n	k	n	k
6	1.5158	-0.193	1.417	-0.0349	1.2746	-0.1753
6.5	1.5652	-0.2301	1.4745	-0.1715	1.3014	-0.2064
7	1.5674	-0.3344	1.4631	-0.1733	1.2499	-0.2489
7.5	1.3459	-0.3756	1.447	-0.2313	1.2325	-0.2654
8	1.5101	-0.3848	1.4198	-0.238	1.2127	-0.2651
8.5	1.4701	-0.4451	1.4053	-0.2361	1.183	-0.2492
9	1.4682	-0.4302	1.4592	-0.2404	1.2378	-0.2346
9.5	1.4505	-0.5697	1.4993	-0.3924	1.2636	-0.3825
10	1.3978	-0.5725	1.4542	-0.4345	1.2329	-0.3875
10.5	1.3509	-0.5554	1.388	-0.4469	1.2291	-0.3541
11	1.3208	-0.5273	1.3404	-0.4349	1.2133	-0.3436
11.5	1.3166	-0.5294	1.3263	-0.4313	1.2023	-0.3401
12	1.3143	-0.5224	1.317	-0.4366	1.1979	-0.3203
12.5	1.304	-0.5225	1.3037	-0.4312	1.1659	-0.3085
13	1.3028	-0.5215	1.2956	-0.4324	1.1509	-0.3108
13.5	1.3056	-0.5215	1.3013	-0.4324	1.1347	-0.3045
14	1.3166	-0.5365	1.3046	-0.4375	1.1269	-0.314

2.4 结果讨论

根据物质与光的相互作用关系, 在任意波长处 m 的实部 n 满足 $n \geq 1$ 条件, 虚部 k 满足 $k \leq 0$ 条件^[11,12]. 表 1 中枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体等 3 种微生物样品在 6—14 μm 的 n 与 k 值满足上述条件. 由于没有关于微生物中远红外复折射率 m 的相关文献, 所以这里以纯水在 8 μm , 9 μm , 10.6 μm 波长处的复折射率 m 作为依据, 进

一步分析表 1 中数据的准确性.

表 2 纯水在部分波长 λ 处的 n 与 k 值

$\lambda/\mu\text{m}$	n	k
8	1.291	-0.0343
9	1.262	-0.0399
10.6	1.178	-0.071
12.5	1.123	-0.259

表 2 为纯水在部分波长处复折射率 m 的实部 n 与虚部 k . 根据文献 [15], 生物颗粒的复折射率实部 n 随着含水量 $w(\%)$ 的增大逐渐减小. 因此, 在任意波长 λ 处, 上述 3 种微生物的 n 大于纯水. 比较表 1 和表 2 中的数据, 在 $8\ \mu\text{m}$, $9\ \mu\text{m}$ 和 $12.5\ \mu\text{m}$ 波长处, 上述 3 种微生物的 n 值计算结果均满足该条件; 在 $10.5\ \mu\text{m}$ 和 $11\ \mu\text{m}$ 波长处, 上述 3 种微生物的 n 值计算结果均大于 1.178. 因此, 论文计算得到的枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体等 3 种微生物在 $6\text{--}14\ \mu\text{m}$ 波段的 n 值是可靠的.

在部分文献中, 通过制作紫外-可见-近红外压片并测定相应的反射率谱来扩大材料反射率谱的实测数据范围 [13]. 作者利用分光光度计测定了上述 4 种样品的紫外-可见-近红外光谱, 代替相应波长处的样品反射光谱的常数外推结果代入 (1)—(3) 式. 计算结果表明, 这一方法虽然拓展了样品的实测数据范围, 但是却为计算结果引入了更大的误差. 分析原因, 是因为紫外-可见-近红外分光光度计和显微红外光谱仪测定材料反射率测定需要分别采用 2 种型号的压片机. 受压片机的压片面积以及压片质量的影响, 即使制片压力相同, 得到的两个压片的紧密程度差异较大, 与镜面反射的接近程度不同, 测定的反射率谱线失去了可比性. 因此, 论文采用紫外-可见-近红外反射谱的实测数据, 而是利用常数外推的方法得到上述 4 种微生物在 $0\text{--}2.5\ \mu\text{m}$ 的反射率.

表 1 中给出的 k 值的绝对值比真实值的绝对值偏大. 文献 [15] 的研究结果表明, 复折射率实部 n 对不同反射率外推值变化不大, 虚部 k 变化的最大值比其绝对值要小一个数量级.

3 微生物样品含水量测定

细胞中含有的水包括自由水和结合水, 采用烘干法可以将自由水充分除去, 但是与生物大分子蛋白质结合的结合水很难完全去除. 如果过度烘干会导致蛋白质、多糖、核酸等物质的结构和组成被破坏, 影响含水量测定结果的准确性. 因此, 采用烘干法称重法测定样品含水量误差较大. 此外, 实验室条件下生物颗粒样品的大量制备较难实现, 而采用烘干法需要的样品量较高, 因此, 论文没有采用烘干法进行样品含水量的测定, 而是以蛋白质、核酸和水的红外吸收为基础, 根据生物样品的傅里叶红外光谱计算其含水量.

3.1 含水量测定的理论基础

压片中生物颗粒质量难以控制, 为了使生物颗粒 A, B, C 的 FTIR 谱线对应相同的样品质量, 首先对原谱线进行 $5.1546\ \mu\text{m}$ ($1940\ \text{cm}^{-1}$) 附近透过率最大值归一化处理. 已知相同质量的生物颗粒 A, B, C 在任意 λ 波长处的透过率 $T_A(\lambda)$, $T_B(\lambda)$ 和 $T_C(\lambda)$, 其中, 生物颗粒 A 为标准样品, 其水、蛋白质和核酸的质量百分比已知. $T_A(\lambda)$, $T_B(\lambda)$ 和 $T_C(\lambda)$ 可以表示为

$$\begin{cases} T_A(\lambda) = [T_w(\lambda)]^{w_{n,A}} \times [T_p(\lambda)]^{w_{p,A}} \times [T_n(\lambda)]^{w_{w,A}}, \\ T_B(\lambda) = [T_w(\lambda)]^{w_{n,B}} \times [T_p(\lambda)]^{w_{p,B}} \times [T_n(\lambda)]^{w_{w,B}}, \\ T_C(\lambda) = [T_w(\lambda)]^{w_{n,C}} \times [T_p(\lambda)]^{w_{p,C}} \times [T_n(\lambda)]^{w_{w,C}}, \end{cases} \quad (4)$$

式中, $w_{w,i}$, $w_{p,i}$ 和 $w_{n,i}$ ($i = A, B, C$) 为样品中水、蛋白质和核酸的质量百分比; $T_w(\lambda)$, $T_p(\lambda)$ 和 $T_n(\lambda)$ 分别为纯水、蛋白质和核酸在任意波长 λ 处的透过率.

$6.4935\ \mu\text{m}$ ($1540\ \text{cm}^{-1}$), $6.0423\ \mu\text{m}$ ($1655\ \text{cm}^{-1}$) 分别属于蛋白质酰胺 II 带和酰胺 I 带, $9.3023\ \mu\text{m}$ ($1075\ \text{cm}^{-1}$), $8.0451\ \mu\text{m}$ ($1243\ \text{cm}^{-1}$) 分别归属于核酸分子内磷酸二酯基团 ($-\text{PO}_2^-$) 的对称和反对称伸缩振动 [16,17]. 纯水在上述 4 个波数附近的透过率约为 100%. 因此, 由 (4) 式可以得到

$$\begin{cases} T_A(\lambda_1) = [T_p(\lambda_1)]^{w_{p,A}} \\ T_B(\lambda'_1) = [T_p(\lambda_1)]^{w_{p,B1}} \\ T_C(\lambda''_1) = [T_p(\lambda_1)]^{w_{p,C1}} \end{cases} \quad (\lambda \approx 6.4935\ \mu\text{m}), \quad (5a)$$

$$\begin{cases} T_A(\lambda_2) = [T_p(\lambda_2)]^{w_{p,A}} \\ T_B(\lambda'_2) = [T_p(\lambda_2)]^{w_{p,B2}} \\ T_C(\lambda''_2) = [T_p(\lambda_2)]^{w_{p,C2}} \end{cases} \quad (\lambda \approx 6.0423\ \mu\text{m}), \quad (5b)$$

$$\begin{cases} T_A(\lambda_3) = [T_n(\lambda_3)]^{w_{n,A}} \\ T_B(\lambda'_3) = [T_n(\lambda_3)]^{w_{n,B1}} \\ T_C(\lambda'_3) = [T_n(\lambda_3)]^{w_{n,C1}} \end{cases} \quad (\lambda \approx 9.3023\ \mu\text{m}), \quad (5c)$$

$$\begin{cases} T_A(\lambda_4) = [T_n(\lambda_4)]^{w_{n,A}} \\ T_B(\lambda'_4) = [T_n(\lambda_4)]^{w_{n,B2}} \\ T_C(\lambda'_4) = [T_n(\lambda_4)]^{w_{n,C2}} \end{cases} \quad (\lambda \approx 8.0451\ \mu\text{m}). \quad (5d)$$

将归一化处理得到生物颗粒样品 A, B, C 在 $6.4935\ \mu\text{m}$, $6.0423\ \mu\text{m}$, $9.3023\ \mu\text{m}$, $8.0451\ \mu\text{m}$ 附近的透过率极小值 $T_A(\lambda)$, $T_B(\lambda)$ 和 $T_C(\lambda)$, 以及 $w_{w,A}$,

$w_{p,A}$ 和 $w_{n,A}$ 代入 (5) 式, 解方程组即可得到 $w_{w,i}$, $w_{p,i}$ 和 $w_{n,i}$ ($i = B, C$).

3.2 微生物样品含水量测定

选择枯草芽孢杆菌样品作为含水量测定的标准样品, 制备大量样品. 利用电子天平称量 8 g 样品放入红外恒温干燥箱中干燥, 适当延长其干燥时间, 每隔半小时测定一次烘干样品的质量, 当其质量不变时取出, 利用电子天平称量得到其含水量约为 25%.

微生物的模拟分子式是在去除细胞中自由水的基础上给出的, 反映了结合水和各种生物大分子的元素组成. 枯草芽孢杆菌的模拟分子式如表 3 所示, 其中 w 为各元素的质量百分比. 由于枯草芽孢

杆菌样品中结合水被完全去除, 因此认为枯草芽孢杆菌样品中各元素的和质量百分比符合表 3. 蛋白质中含氮量变化较小通常采用 16%. 根据含氮量来估计蛋白质含量, 得到枯草芽孢杆菌样品中蛋白质的质量百分比为 62.5%. 那么, 核酸占干重的百分数为 12.5%.

表 3 枯草芽孢杆菌模拟分子式

元素名称	碳	氢	氧	氮	磷	硫
$w/\%$	50	10	20	10	4	1

图 3 为波数 1940 cm^{-1} 附近透过率最大值归一化处理后得到的枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体样品的 FTIR 谱线, 每条谱线为三次测定谱线的均值.

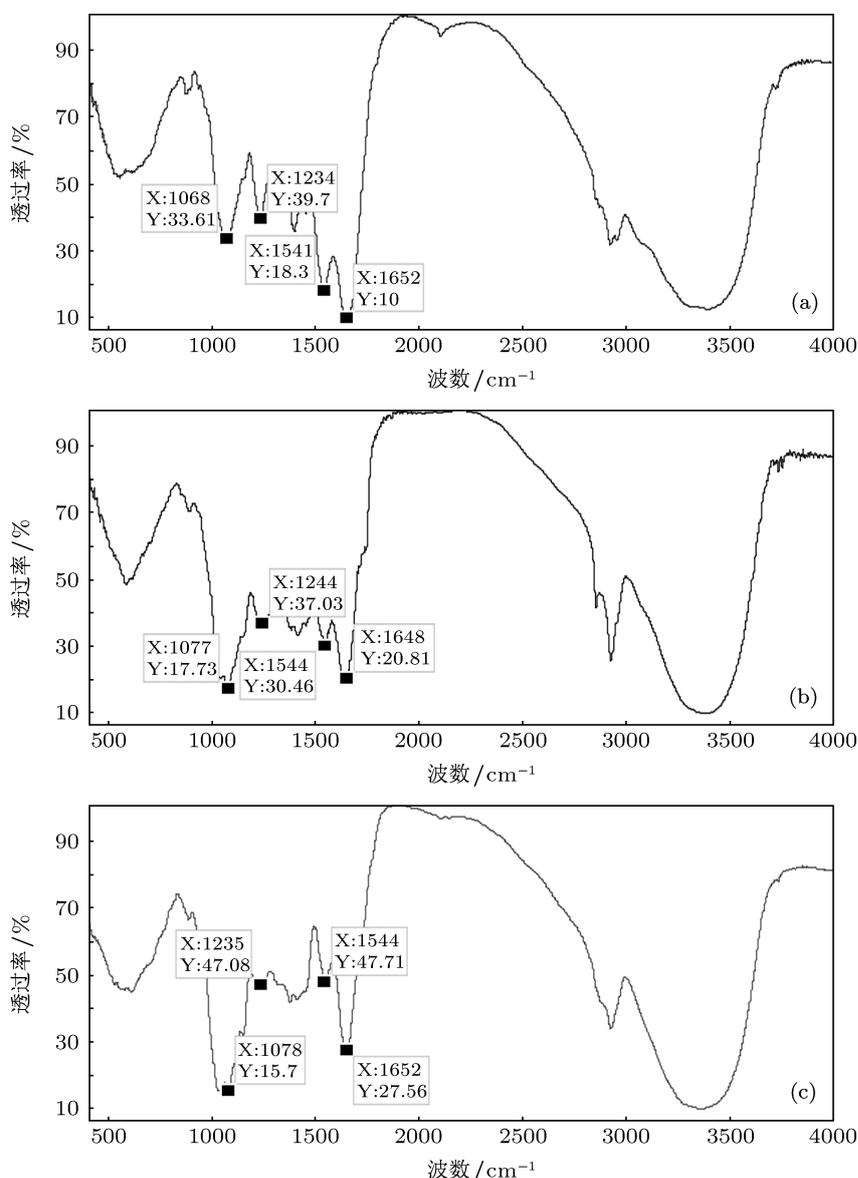


图 3 枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体归一化处理后得到的 FTIR 谱线 (a) 枯草芽孢杆菌; (b) 黑曲霉孢子; (c) 黑曲霉菌丝体

图 3 中标出了各样品在上述波数附近的透过率极值点. 将图中各点对应的横坐标由波数 (wave number) (cm^{-1}) 转换成波长 λ (μm). 表 4 为枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体样品在 6.4935 μm , 6.0423 μm , 9.3023 μm , 8.0451 μm 波长附近的透过率极小值 T .

将表 4 中数据代入 (5) 式, 计算黑曲霉菌丝体和黑曲霉孢子样品中蛋白质、核酸和水的质量百分数. 计算结果如表 5 所示, 表中 λ 为对应表 4 中的特征吸收峰波长, w 为根据不同波长 λ 处数据计算得到的各成分的质量百分数, w_{average} 为两次计算得到的黑曲霉孢子或黑曲霉菌丝体样品中蛋白质或核酸质量百分数的均值, 水的 w_{average} 值等于 100% 减去蛋白质与核酸的 w_{average} 之和.

表 4 枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体压在 6.4935 μm , 6.0423 μm , 9.3023 μm , 8.0451 μm 附近的透过率 T 极小值

样品名称	$\lambda/\mu\text{m}$	$T/\%$
枯草芽孢杆菌	9.3633	33.61
	8.1037	39.7
	6.4893	18.3
黑曲霉孢子	6.0533	10
	9.2851	17.73
	8.0451	37.03
	6.4767	30.46
黑曲霉菌丝体	6.0680	20.81
	9.2764	15.7
	8.0972	47.08
	6.4767	47.71
	6.0533	27.56

表 5 黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体样品中蛋白质、核酸和水的质量百分数

样品名称	成分名称	$\lambda/\mu\text{m}$	$w/\%$	$w_{\text{average}}/\%$
黑曲霉孢子	蛋白质	6.4767	43.77	43.2
		6.0680	42.63	
	核酸	9.2851	19.84	16.64
		8.0451	13.44	
	水	—	—	40.16
黑曲霉菌丝体	蛋白质	6.4893	27.25	31.13
		6.0533	35	
	核酸	9.3023	21.24	15.72
		8.0451	10.19	
	水	—	—	53.15

表 5 中, 蛋白质、核酸在同一样品中 2 个吸

收峰处的质量百分数计算结果不同, 这是因为计算过程中, 假设生物样品中仅含有水、蛋白质和核酸, 而实际上生物样品中还含有一定量的多糖、脂质等有机物. 这些有机物分子中同样存在酰胺基团和磷酸二酯基团, 对蛋白质在 6.4935 μm , 6.0423 μm 以及核酸在 9.3023 μm , 8.0451 μm 处的吸收存在干扰.

4 生物颗粒远红外波段复折射率模型

4.1 模型构建

Ross 和 Biliing 的研究结果表明, 生物颗粒在可见光波段的复折射率实部 n 的模型为 [15]

$$m(\lambda) = m_w(\lambda) + A(100 - w_w), \quad (6)$$

其中, $n(\lambda)$ 为生物颗粒在波长 λ 处的复折射率实部; $n_w(\lambda)$ 为纯水在波长 λ 处的复折射率实部; A 为常数, 等于 0.015 或 0.018; w_w (%) 为生物颗粒含水量.

(6) 式表明, 生物颗粒的复折射率实部 n 与其含水量 w_w 关系密切. 设远红外波段 (6—14 μm), 生物颗粒的复折射率虚部 k 为零, 其复折射率模型为

$$m(\lambda) = m_w(\lambda) + A_1(100 - w_w)^2 + A_2(100 - w_w), \quad (7)$$

其中, $m(\lambda)$ 为生物颗粒在波长 λ 处的复折射率, $m(\lambda) = n(\lambda)$; $m_w(\lambda)$ 为纯水在波长 λ 处的复折射率, $m_w(\lambda) = n_w(\lambda)$; A_1, A_2 为常数.

根据 (7) 式所示的生物颗粒复折射率模型, 若已知 3 种或 3 种以上生物颗粒的含水量 w_{wi} 以及生物颗粒的复折射率 $m_i(\lambda)$ ($i = 1, 2, 3$), 可计算出常数 A_1, A_2 , 即

$$\begin{bmatrix} m_1(\lambda) \\ m_2(\lambda) \\ m_3(\lambda) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} m_w(\lambda) \\ m_w(\lambda) \\ m_w(\lambda) \end{bmatrix} + A_1 \begin{bmatrix} (100 - w_{w,1})^2 \\ (100 - w_{w,2})^2 \\ (100 - w_{w,3})^2 \end{bmatrix} + A_2 \begin{bmatrix} 100 - w_{w,1} \\ 100 - w_{w,2} \\ 100 - w_{w,3} \end{bmatrix}, \quad (8)$$

其中, $m_w(\lambda)$ 为纯水在任意波长 λ 处的复折射率. (8) 式的解 A_1, A_2 为

$$A_1 = \frac{(m_1 - m_2)(w_3 - w_1) - (m_1 - m_3)(w_2 - w_1)}{[(100 - w_1)^2 - (100 - w_2)^2](w_3 - w_1) - [(100 - w_1)^2 - (100 - w_3)^2](w_2 - w_1)} \quad (9a)$$

$$A_2 = \frac{(m_1 - m_2)[(1 - w_1)^2 - (1 - w_3)^2] - (m_1 - m_3)[(1 - w_1)^2 - (1 - w_2)^2]}{[(100 - w_1)^2 - (100 - w_3)^2](w_2 - w_1) - [(100 - w_1)^2 - (100 - w_2)^2](w_3 - w_1)}. \quad (9b)$$

4.2 基于实测数据的模型参数计算

已知枯草芽孢杆菌、黑曲霉菌丝体以及黑曲霉孢子样品的含水量 $w_w\%$ 分别等于 25%, 53.15% 和 40.16%, 将表 1 中给出的枯草芽孢杆菌、黑曲霉菌丝体和黑曲霉孢子在 6—14 μm 波段的复折射率 $m_i(\lambda)$ 代入 (9) 式, 得到 6—14 μm 波段内波长 λ 处的 A_1, A_2 如表 6 所示, 表中还给出了 $-100A_1$ 在各波长处的值.

表 6 6—14 μm 波段内波长 λ 处的 A_1, A_2 和 $100A_1$

$\lambda/\mu\text{m}$	$A_1/10^{-4}$	A_2	$-100A_1/10^{-2}$
6	-0.158	0.0278	0.00158
6.5	0.904	0.0037	-0.00904
7	-3.386	0.0525	0.03386
7.5	-3.546	0.0543	0.03546
8	-3.546	0.0538	0.03546
8.5	-4.562	0.0658	0.04562
9	-5.844	0.0794	0.05844
9.5	-7.591	0.0991	0.07591
10	-8.739	0.1141	0.08739
10.5	-7.4	0.0973	0.074
11	-6.396	0.085	0.06396
11.5	-6.081	0.0814	0.06081
12	-5.781	0.0778	0.05781
12.5	-5.673	0.0765	0.05673
13	-5.157	0.07	0.05157
13.5	-5.276	0.0714	0.05276
14	-5.123	0.0699	0.05123
Average	-5.6067	0.0766	0.0561

当 $w_w = 0$ 时, (6) 式可以写成

$$m(\lambda) = m_w(\lambda) + 10000A_1 + 100A_2. \quad (10)$$

如前所述, $m(\lambda)$ 与 $m_w(\lambda)$ 满足条件 $m(\lambda) \geq m_w(\lambda)$, 因此, A_1, A_2 满足

$$A_2 \geq -100A_1. \quad (11)$$

表 6 给出的 7—14 μm 波段 A_1, A_2 计算结果满足 (11) 式, 并且 A_1, A_2 在 7—14 μm 波段的不同波长 λ 处的计算结果相近 (没有数量级的差异). 因此, 判断生物颗粒在远红外波段任意波长 λ 处的复折射率满足 (7) 式给出的生物颗粒中远红外波段复折射率模型. 表中 6 μm 和 6.5 μm 处的 A_1, A_2 计算结果与其他波长处的计算结果差异明显, 与反射谱在短波段的常数外推引起的误差有关. 在表中标出的 6 μm 和 6.5 μm 处的 A_1, A_2 计算结果不参与 A_1, A_2 以及 $-100A_1$ 的均值计算.

论文采用表 6 给出的 A_1, A_2 在 7—14 μm 波段的平均值作为生物颗粒远红外波段复折射率模型中的 A_1, A_2 参数, 得到生物颗粒远红外波段复折射率模型为

$$m(\lambda) = m_w(\lambda) - 5.6067 \times 10^{-4} \times (100 - w_w)^2 + 0.0766 \times (100 - w_w). \quad (12)$$

令

$$f = 766 - 5.6067(100 - w_w) = 205.33 + 5.6067w_w, \quad (13)$$

式中, 当 $w_w \leq 10$ 时, $f \approx 205$, (12) 式可以改写成

$$m(\lambda) = m_w(\lambda) + 0.0205(100 - w_w). \quad (14)$$

因此, 生物颗粒远红外波段复折射率模型为

$$m(\lambda) = \begin{cases} m_w(\lambda) - 5.6067 \times 10^{-4} \times (100 - w_w)^2 + 0.0766 \times (100 - w_w), & (w_w \geq 10), \\ m_w(\lambda) + 0.0205(100 - w_w), & (w_w < 10). \end{cases} \quad (15)$$

需要指出的是, 论文给出的 (15) 式所示的生物颗粒远红外波段复折射率模型应用了实际测量的数据. 实验仪器的性能、仪器操作以及计算方法影响模型中参数的计算结果, 因此, (15) 式所示的生物颗粒中远红外波段复折射率模型是一个近似模型, 但是其与真实值的差距较小, 不会存在数量级的差异. (7) 式为生物颗粒远红外波段复折射率模型的通用形式.

5 结论

论文采用显微红外光谱仪测定枯草芽孢杆菌、黑曲霉孢子和黑曲霉菌丝体等 3 种微生物样品的红外反射谱, 保证了样品压片在单个光斑范围内表

面平滑度较好, 使提高了谱线测试结果的准确性大大提高. 采用常数外推方法拓宽样品反射谱并利用 K-K 关系反射相移 $\Theta(\lambda)$ 和复折射率 m 的实部 n 与虚部 k . 结果表明, 基于反射光谱法计算得到的微生物样品在 6—14 μm 波段范围内的实部 n 值与其真实值符合. 以枯草芽孢杆菌样品作为标准样品, 以水、蛋白质和核酸的吸收为基础, 根据 FTIR 谱计算 3 种微生物样品的含水量. 论文构建了生物颗粒远红外波段复折射率模型, 根据 3 种微生物样品含水量以及 6—14 μm 波段范围内的复折射率确定模型中的参数. 根据该模型, 生物颗粒含水量计算其远红外波段复折射率, 进而为生物颗粒电磁散射特性分析以及不同种类生物颗粒的快速识别提供有效依据.

-
- [1] Nachman P, Chen G, Pinnick R G, Hill S C, Chang R K, Mayo M W, Fernandez G L 1996 *Appl. Opt.* **35** 1069
- [2] Dalterio R A, Nelson W H, Britt D, Sperry J, Psaras D, Tanguay J F, Suid S L 1986 *Appl. Spectrosc.* **40** 86
- [3] Dalterio R A, Nelson W H, Britt D, Sperry J, Tanguay J F, Suid S L 1987 *Appl. Spectrosc.* **41** 234
- [4] Bronk B V, Reinisch L 1993 *Appl. Spectrosc.* **47** 436
- [5] Pinnick R G, Hill S C, Nachman P 1995 *Aerosol Science and Technology* **23** 653
- [6] Feng C X, Huang L H, Zhou G C, Han J, Zeng A J, Zhao Y K, Huang H J 2010 *Chinese Journal of Lasers* **37** 2593 (in Chinese) [冯春霞, 黄立华, 周光超, 韩杰, 曾爱军, 赵永凯, 黄惠杰 2010 中国激光 **37** 2593]
- [7] Lan T G, Xiong W, Fang Y H, Li D C, Yuan Y M 2010 *Acta Optica Sinica* **30** 1656 (in Chinese) [兰天鸽, 熊伟, 方勇华, 李大成, 袁越明 2010 光学学报 **30** 1656]
- [8] Tuminello P S, Arakawa E T, Khare B N 1997 *Appl. Opt.* **36** 2818
- [9] Grosse P, Offermann V 1991 *Appl. Phys.* **52** 138
- [10] Booi H C, Thoone G P J M 1982 *Rheol. Acta.* **21** 15
- [11] Bohren C F, Huffman D R 1983 *Absorption and scattering of light by small particles.* (New York: John Wiley & Sons, Inc.) p228
- [12] Bohren C F, Huffman D R 2009 *Principles of Optics Electromagnetic Theory of Propagation, Inference and Diffraction of Light* (Beijing: Publishing House of Electronics Industry) p32 (in Chinese)
- [13] Dou Z W, Li X X, Zhao J J 2001 *Acta Armamentaria* **32** 498
- [14] Rosenheimer M S, Linker R 2009 *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* **110** 1147
- [15] Ross K F A, Billinge E 1957 *J. Gen. Microbiol.* **16** 418
- [16] Ci Y X, Zang K S, Gao T Y 2002 *Chemical Journal of Chinese Universities* **23** 1047 (in Chinese) [慈云祥, 臧凯赛, 高体玉 2002 高等学校化学学报 **23** 1047]
- [17] Li J W, Si M Z 2009 *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory* **26** 888 (in Chinese) [李家旺, 司民真 2009 光谱实验室 **26** 888]

Determination and model construction of microbes' complex refractive index in far infrared band*

Sun Du-Juan Hu Yi-Hua[†] Gu You-Lin Wang Yong Li Le

(State Key Laboratory of Pulsed Power Laser Technology (Electronic Engineering Institute, Hefei 230037, China)

(Anhui Province Key Laboratory of Electronic Restriction Technology, Hefei 230037, China)

(Received 21 September 2012; revised manuscript received 7 January 2013)

Abstract

Bacillus subtilis, Aspergillus niger spore and Aspergillus niger mycelium are chosen for samples preparation. The above three samples' reflection spectra in 2.5—15 μm band are recorded by using infrared microscopic spectrometer. From Kramers-Kronig (K-K) relationship, microbe samples' complex refractive indexes in 6—14 μm band are calculated. According to the microbe samples' absorption spectra, their water contents are calculated using the absorption characteristics of water, protein and nucleic acid. Based on the above three microbe samples' water contents and complex refractive indexes in far infrared band, biologic particle's complex refractive index model in 6—14 μm band are constructed and the model's reliability is analyzed. The construction of biologic particle's complex refractive index model has important significance in the development of rapid analysis and identification method of biologic samples, and the detection and identification technologies of biologic aerosol.

Keywords: optical parameters, complex refractive index of microbe, far infrared band

PACS: 42.87.—d, 42.87.Bg

DOI: 10.7498/aps.62.094218

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61271353).

[†] Corresponding author. E-mail: skl_hyh@163.com